

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-139457

(P2000-139457A)

(43) 公開日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 9/12		C 1 2 N 9/12	4 B 0 2 4
1/21		1/21	4 B 0 5 0
15/09	Z N A	15/00	Z N A A 4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 9/12			
C 1 2 R 1:92)			

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-319241	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成10年11月10日 (1998.11.10)	(72) 発明者	荒川 琢 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	西矢 芳昭 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	川上 文清 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型逆転写酵素

(57) 【要約】

【課題】従来よりもより高い温度域において反応できる、完全長のcDNAが取得するのに十分な伸長性の高い逆転写酵素を提供する。

【解決手段】野生型に比して、特に42～60℃の範囲で伸長性を向上せしめたモロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) に由来する変異型逆転写酵素。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 野生型に比して伸長性が向上したことを特徴とする変異型逆転写酵素。

【請求項2】 伸長性が42～60℃の範囲で向上した請求項1記載の変異型逆転写酵素。

【請求項3】 RNaseH活性を実質的に有していない請求項1または2に記載の変異型逆転写酵素。

【請求項4】 Tyr Met Asp Asp で表されるアミノ酸配列を含む請求項1～3のいずれかに記載の変異型逆転写酵素。

【請求項5】 モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)に由来する請求項1～4のいずれかに記載の変異型逆転写酵素。

【請求項6】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなる請求項5記載の変異型逆転写酵素。

【請求項7】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有することを特徴とするDNAフラグメント。

【請求項8】 配列番号2に記載されるヌクレオチド配列を含む請求項7記載のDNAフラグメント。

【請求項9】 請求項7または8に記載のDNAフラグメントをベクターに挿入したことを特徴とするDNA組換えベクター。

【請求項10】 請求項9記載のDNA組換えベクターを用いて形質転換されたことを特徴とする組換え宿主細胞。

【請求項11】 宿主細胞がエシェリヒア・コリ(Escherichia coli)である請求項10記載の組換え宿主細胞。

【請求項12】 請求項10または11に記載の組換え宿主を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする変異型逆転写酵素の製造方法。

【請求項13】 請求項1～6のいずれかに記載の変異型逆転写酵素を用い、かつRNAを鋳型とすることを特徴とするcDNAの合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は伸長性特に高温域での伸長性に優れた逆転写酵素、該逆転写酵素をコードする遺伝子および該遺伝子を使用する該逆転写酵素の製造方法ならびに該逆転写酵素を利用したcDNAの合成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来からレトロウイルス、特にモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)やヒト後天性免疫不全ウイルス(HIV)、トリ骨髄芽症ウイルス(AMV)由来の逆転写酵素については多くの研究がなされ、様々な機能、性質が知られてきている。加えて、RNAを鋳型としてこれに相補的なDNA(cDNA)を合成することができるという特徴的な性質により、多くの分

子生物学的手法、例えばcDNAライブラリーの構築、RT-PCRなどに用いられている。mRNAの塩基配列は、発現されている蛋白質のアミノ酸配列を反映していることから、その解析の意義は遺伝子産物の機能を知る上で非常に大きい。

【0003】一方、これまでに報告されているレトロウイルス由来の逆転写酵素の多くが、DNA-RNAハイブリッド2本鎖のRNAを分解する活性、すなわちRNaseH活性を有することが知られている。この活性の存在は、cDNAを合成する際に鋳型-プライマー複合体の鋳型を分解し、その分解位置がプライマーの3'端に近い場合は、鋳型-プライマー複合体が解離されるため伸長性が低下するという結果を招く。このような問題を排除するため、実質的にRNaseH活性を有していない逆転写酵素が開発されてきた。

【0004】モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)由来の逆転写酵素は、そのアミノ酸配列の相同性および様々な機能解析から、その蛋白質のC末端側約200残基がRNaseH活性を担うドメインであることが知られている(Reversetranscriptase, Cold Spring Harbor Monograph 第135～162頁、1993年)。現在、RNaseH活性を欠失したMMLV由来の逆転写酵素としては、RNaseHドメインのアミノ酸を削除したデリーション型が東洋紡績から、アミノ酸の置換により機能を欠失した点変異型がスーパースクリプトIIという商品名でライフテクノロジー社から入手することが可能である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの逆転写酵素をもってしても完全長のcDNAが取得できない場合がある。その理由としては、鋳型RNAの配列に起因する高次構造のため逆転写酵素の結合が阻害される、あるいは合成途上のDNA鎖の3'末端に鋳型RNAと相補的でないヌクレオチドが取り込まれ伸長反応が阻害されるといったことが考えられている。そのため、従来のものよりも、より高い温度域において反応できる伸長性の高い逆転写酵素の開発が待ち望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】これまで報告されている逆転写酵素のアミノ酸配列はいくつかの共通の保存領域を有するが、その中でもTyr(タイロシン)-X-Asp(アスパラギン酸)-Asp(アスパラギン酸)で表される配列はほとんどの逆転写酵素に存在する。Xについては様々なバリエーションがあり、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)カリフラワーモザイクウイルス(CAMV)ではバリン、ヒト後天性免疫不全ウイルス(HIV)、ラウスサルコーマウイルス(RSV)ではメチオニンなどである。この領域は結晶構造解析などから2価金属イオンの結合部位として機能することが

知られており、酵素活性の発現に重要な役割を果たしている (Structure 第15巻、第879～892頁、1995年)。

【0007】さらに最近になって、Xのアミノ酸の種類がHIV由来の逆転写酵素の伸長性に大きく関与しているという報告がなされた。すなわち、HIV由来の逆転写酵素の野生型はXの位置にメチオニンをもつが、これをバリンあるいはスレオニンに変換すると、鋳型に対して誤ったヌクレオチドが取り込まれた (ミスインコーポレーションされた) 伸長鎖の3'端を伸長する能力が低下するという現象が報告されている (Nucleic Acids Research 第25巻、第3212～3217頁、1997年)。

【0008】本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意検討の結果、MMLV由来の逆転写酵素にポイントミューテーションによる改良を加えることにより、野生型の該逆転写酵素に比して伸長性、耐熱性を向上することができるを見出し、本発明に到達した。その具体的な例としては、MMLV由来の逆転写酵素の584番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換するアミノ酸変異を加え、RNase H活性を欠失したものに、さらに上述の保存領域のXに相当する224番目のバリンをメチオニンに置換するアミノ酸変異を加えることにより、cDNA合成の伸長性が、従来の反応温度領域である42℃から従来は反応性に乏しかった60℃の間で向上せしめるものである。

【0009】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 野生型に比して伸長性が向上したことを特徴とする変異型逆転写酵素。

(2) 伸長性が42～60℃の範囲で向上した(1)の変異型逆転写酵素。

(3) RNase H活性を実質的に有していない(1)または(2)の変異型逆転写酵素。

(4) Tyr Met Asp Asp で表されるアミノ酸配列を含む(1)～(3)のいずれかの変異型逆転写酵素。

(5) モロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) に由来する(1)～(4)のいずれかの変異型逆転写酵素。

(6) 配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなる(5)の変異型逆転写酵素。

(7) 配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有することを特徴とするDNAフラグメント。

(8) 配列番号2に記載されるヌクレオチド配列を含む(7)のDNAフラグメント。

(9) (7)または(8)のDNAフラグメントをベクターに挿入したことを特徴とするDNA組換えベクター。

(10) (9)のDNA組換えベクターを用いて形質転換されたことを特徴とする組換え宿主細胞。

(11) 宿主細胞がエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) である(10)の組換え宿主細胞。

(12) (10)または(11)の組換え宿主を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする変異型逆転写酵素の製造方法。

(13) (1)～(6)いずれかの変異型逆転写酵素を用い、かつRNAを鋳型とすることを特徴とするcDNAの合成方法。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明における変異型逆転写酵素は、野生型に比してcDNA合成の伸長性が向上したことを特徴とするものである。特に42～60℃の範囲において、すなわち、従来の反応温度領域である42℃から、従来は反応性に乏しかった60℃までの間で向上したものである。ここで、逆転写酵素の伸長性とは、より長いcDNAを合成する能力のことをいう。また、変異型逆転写酵素とは、野生型逆転写酵素に対しアミノ酸の置換、欠失、挿入等の変異操作を行うことにより得られるものをいう。

【0011】本発明における変異型逆転写酵素は、好適にはRNase H活性を実質的に有していない。ここで、RNase H活性を実質的に有していないとは、逆転写活性1ユニットにつきRNase H活性 10^{-6} ユニット以下のものをいう。

【0012】本発明における逆転写酵素の好適な例としては、Tyr Met Asp Asp で表されるアミノ酸配列を含んでいる。該アミノ酸配列を有する逆転写酵素は、例えば、MMLV由来の逆転写酵素にアミノ酸変異を導入することにより得ることができる。本発明においてアミノ酸変異の導入は、当業者がなし得る方法であればいかなる方法でもよい。例えば、サイトディレクテッドミュータジェネシス法が挙げられる (Methods Enzymol. 第154巻、第382頁、1987年)。

【0013】本発明のDNAフラグメントは、伸長性の向上した変異型逆転写酵素をコードするDNAであり、該DNAフラグメントの一例は配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する。また、このようなDNAは配列番号2に記載される塩基配列またはその一部分を含有する。

【0014】さらに本発明のDNA組換えベクターは、上記DNAフラグメントをベクターに挿入することにより得られるものである。該ベクターは、変異型逆転写酵素のクローニング及び発現を可能とするものであればいかなるものでもよく、例えばファージ及びプラスミドが挙げられる。プラスミドとしてはpUC118、pUC18、pBR322、pBluescript、pLED-M1、p73、pGW7、pET3a、pET8cなどが挙げられる。一方、ファージとしては例えば λ gt11、 λ ZAPIIなどが挙げられる。

【0015】また本発明の組換え宿主細胞は、上記DN

A組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換することにより得られるものである。該宿主細胞としては、大腸菌、酵母などが挙げられ、特に大腸菌が好ましい。大腸菌としては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) DH5 α 、JM109、HB101、XL1Blue、PR1、HS641 (DE3)、BL21 (DE3) などが挙げられる。すなわち、本発明においては、上記の伸長性の向上した変異型逆転写酵素をコードする遺伝子を上記ベクターに挿入してDNA組換えベクターとし、さらに該組換え発現ベクターにて宿主細胞を形質転換する。

【0016】また、本発明における変異型逆転写酵素の製造方法は、上記組換え宿主細胞を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする。該組換え宿主細胞の培養に使用する培地ならびに条件は常法に従う。具体例としては、伸長性の向上した変異型逆転写酵素遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された大腸菌を、例えばTB培地に培養することにより、該変異型逆転写酵素を得ることができる。

【0017】上記変異型逆転写酵素の精製方法としては、例えば、(a) 組換え宿主を集めた後、破碎して、細胞抽出物を調製し、(b) 宿主細胞由来の不純蛋白質を除去する工程を含む。組換え宿主細胞より産出された伸長性の向上した変異型逆転写酵素は、宿主菌体を培地で培養後、培養液から遠心分離等にて分離・回収する。該菌体を緩衝液に再懸濁した後、超音波処理、ダイノミル・フレンチプレス等により菌体を破碎する。

【0018】次いで、カラムクロマトグラフィーを実施し、伸長性の向上した変異型逆転写酵素を回収する。カラムクロマトグラフィーは、陽イオン交換体、例えばフォスホセルロース、あるいは疎水性吸着体、例えばブチルセファロース、あるいはアフィニティー吸着体へパリンセファロースなどが好ましい。

【0019】上記のようにして取得した伸長性の向上した変異型逆転写酵素の分子量は、好ましくは約74KD α である。

【0020】本発明における変異型逆転写酵素を用いることにより、RNAを鋳型とし、より長いcDNAを合成することを可能とする。本発明における変異型逆転写酵素を用いて合成可能なcDNAの長さは、その反応条件等によっても異なるが、少なくとも9.4kb以上の伸長が可能であり、条件次第では従来の逆転写酵素を用いては実現出来なかった14kb以上の伸長も可能とする。本発明の変異型逆転写酵素を用いた場合、同一の条件で従来の野生型の逆転写酵素を用いた場合とその伸長性を対比した場合、2倍以上の伸長性を増大することができる。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0022】実施例1 MMLV逆転写酵素への点突然変異の導入

野生型MMLV逆転写酵素発現プラスミドpRT30-2はコロンビア大学・ゴッフ教授より分譲入手した。

【0023】点突然変異の導入はトランスフォーマーキット(クロンテック製)を用い、説明書の指示に従って行った。2種の制限酵素選択プライマーおよび2種の変異導入プライマー(配列番号3、4、5、6)を合成した。配列番号3はベータラクタマーゼ遺伝子中のScal部位をMluIに変換するプライマーである。配列番号4は上記で変換されたベータラクタマーゼ遺伝子中のMluI部位をScalに変換するプライマーである。配列番号5はMMLV逆転写酵素遺伝子中の670番目のグアニンをアデニンに変換する(すなわち、アミノ酸配列の224番目のバリンをメチオニンに変換する)プライマーである。配列番号6はMMLV逆転写酵素遺伝子中の1750番目のグアニンをアデニンに変換する(すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸をアスパラギンに変換する)プライマーである。

【0024】それぞれのプライマー200pmolを1mM ATP、5ユニット ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡績製)を含むキナーゼバッファー中、37℃で30分間インキュベートし、5'末端をリン酸化した。その後、75℃で15分間インキュベートしてポリヌクレオチドキナーゼを失活させた。

【0025】pRT30-2 0.1 μ g、5'末端をリン酸化した配列番号3および6のプライマーをそれぞれ10pmol、上記キット添付のアニーリングバッファー2 μ lを含む20 μ lの溶液を、100℃で3分間インキュベートした後、直ちに5分間氷冷した。

【0026】これに蒸留水5 μ l、キット添付のシスシスバッファー3 μ l、T4リガーゼ1 μ l、T4DNAポリメラーゼ1 μ lを加え、37℃で1時間インキュベートした後、75℃で15分間インキュベートし酵素を失活させた。これにHバッファー3 μ l、Scal20ユニットを加え37℃で2時間インキュベートした。

【0027】このうち1 μ lをエシェリヒア・コリBMH71-18株コンピテントセル100 μ lに加え、30分間氷冷した後、42℃で30秒間インキュベートし、900 μ lのSOC培地を加え37℃で1時間インキュベートした。これに50 μ g/mlのアンプシリンを含むLB培地5mlを加え、37℃で一晩インキュベートした。

【0028】上記のようにして得られた菌体から定法によりプラスミドを抽出し、そのうち50ngにScal10ユニット、Hバッファー2 μ lを加え全量を20 μ lとし、37℃で2時間インキュベートした。この反応液2 μ lをエシェリヒア・コリDH5 α コンピテントセルに加えて、定法に従い形質転換した。

【0029】上記のようにして得られたコロニーをLB

培地2. 5mlに懸濁し、一晚培養した後、定法に従いプラスミドを抽出した。このプラスミドがMluIで切断されるものについて塩基配列をサンガー法で確認し、MMLV逆転写酵素遺伝子中の1747番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変換されている）プラスミドpD584Nを取得した。

【0030】上記と同様にして、配列番号5のプライマーを用い、MMLV逆転写酵素遺伝子中の670番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の223番目のバリンがメチオニンに変換されている）プラスミドpV224Mを取得した。

【0031】また、pD584Nをもとに配列番号4および5のプライマーを用い1750番目のグアニンがアデニンに変換され（すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変換されている）、かつ670番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の224番目のバリンがメチオニンに変換されている）プラスミドpDNVMを取得した。

【0032】実施例2 形質転換体の作製

実施例1で得られた各プラスミド1ngをエシエリヒア・コリDH5α100μlに加え、30分間氷冷した後、42℃で30秒間インキュベートし、900μlのSOC培地を加え37℃で1時間インキュベートした。これを50μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上にて37℃で一晩インキュベートし、形質転換体を得た。

【0033】実施例3 形質転換体の培養

実施例2で得られた各形質転換体を100μg/mlのアンピシリンを含むTB培地100mlに懸濁し、37℃で一晩インキュベートした。得られた菌体を12,000回転/分で5分間遠心分離することにより回収した。

【0034】実施例4 MMLV逆転写酵素の精製

実施例3で得られたそれぞれの菌体について以下の操作*

蒸留水	12μl
5×1st strand synthesis buffer	2.0μl (LifeTech製)
10mM dNTP	2.0μl
(α-32P) dTTP (370kBq/μl)	1.0μl
RNA Ladder	0.5μl (LifeTech製)
100pmol/μl (dT) 30	1.0μl
RNaseインヒビター (20units/μl)	0.5μl
逆転写酵素 (10units/μl)	1.0μl

【0038】比較のため、逆転写酵素は野生型、RNaseH欠失型（東洋紡製）、Superscript II (LifeTech製) および実施例4で得られたV223M+D583Nを用いた。これを42℃、50℃、55℃、60℃で1時間インキュベートした。停止液 (20mM Tris-HCl (pH8.0)、10×50

*を行った。菌体10gをバッファー1 (20mMトリス-塩酸 (pH7.5)、5mM EDTA、5mMメルカプトエタノール、100mM塩化ナトリウム) 20mlに懸濁した。これを超音波破砕機で破砕し、12000回転/分で10分間遠心分離することにより沈殿を分離した。得られた上清に0.6%ポリエチレンイミン溶液を0.4ml添加し、30分間攪拌した。これを12000回転/分で10分間遠心分離することにより沈殿を分離し、上清を回収した。この液に硫酸アンモニウムを4.56g加え、30分間攪拌した。これを12000回転/分で10分間遠心分離することにより沈殿を分離し回収した。

【0035】得られた沈殿をバッファー2 (20mMトリス-塩酸 (pH7.5)、0.1mM EDTA、5mMメルカプトエタノール、50mM塩化ナトリウム、10%グリセロール) 5mlに溶解し、100mlのバッファー2に対して透析した。これをDEAEセファロースカラム (5ml) にチャージし、非吸着画分を回収した。これをフォスフォセルロースカラム (5ml) にチャージし、10mlのバッファー2で洗浄後、0~500mM NaClのグラジエントバッファー2 40mlで溶出した。

【0036】得られたフラクションのうち、逆転写酵素活性を含みRNaseH活性を有していない画分をプールした。次いで、これをヘパリンセファロースカラム (3ml) に供し、0~1M NaClのグラジエントバッファー2により溶出し、逆転写酵素活性を含む画分を回収した。以上の操作により、SDS-PAGEにおいてほぼ単一のバンドを示す10mgの蛋白質を得た。pD584Nを有する菌体から得られた蛋白質をD584N、pV224Mを有する菌体から得られた蛋白質をV224M、pDNVMを有する菌体から得られた蛋白質をV224M+D584Nとした。

【0037】実施例5 cDNA合成伸長能力の比較
下記の組成物を調製した、

※mM EDTA、0.05%BPB、20%グリセロール) を4μl加えて反応終了後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルドライヤーにてゲルを乾燥した後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、V224M+D584Nで合成を行ったものは42℃から60℃の間で他の酵素に比べ、より長いcDNAの伸長

が観察された。

【0039】実施例6 RT-PCRによるcDNA合成伸長能力の比較

ヒトジストロフィンのmRNAは約14kbの長さを持つことが知られている。配列番号7に示されるオリゴヌクレオチドはこのmRNAの3'端に相補的に結合するように設計されている。このプライマーを用いてcDNA合成反応を行った後、配列番号8および9に示される*

*プライマーセットを用いPCRを行った。このプライマーセットはmRNAの5'端約400bpを増幅するように設計されており、cDNA合成が5'端まで到達していれば増幅が確認できる。

【0040】cDNA合成反応は以下の反応液を調製し、42℃で30分インキュベートすることにより行った。

【0041】

蒸留水	11μl
5×1st strand synthesis buffer	4.0μl (東洋紡績製)
10mM dNTP	2.0μl
ヒト骨格筋polyA+RNA (0.1μg/μl)	1.0μl (CloneTech 製)
プライマー配列番号7 (10pmol/μl)	1.0μl
逆転写酵素 (100units/μl)	1.0μl

【0042】PCRは以下の反応液を調製し、98℃で ※ことにより行った。

30秒、68℃で30秒の熱サイクルを30回繰り返す※

【0043】

蒸留水	7.0μl
10×KOD dash buffer	2.0μl (東洋紡績製)
cDNA合成反応液	8.0μl
プライマー配列番号8 (10pmol/μl)	1.0μl
プライマー配列番号9 (10pmol/μl)	1.0μl
KOD dash (2.5units/μl)	1.0μl (東洋紡績製)

【0044】熱サイクル終了後、反応液5μlをアガロースゲル電気泳動に供し、増幅産物を検出した。その結果、図2に示されるようにV224M+D584NでcDNA合成を行ったものは増幅産物が確認され、約14kbのcDNAが合成されていることが示唆されたが、野生型およびスーパースクリプトIIにおいては増幅産物が観察されなかった。これよりV224M+D584Nはこれらの酵素に比べて、より長いcDNAの伸長が可能であることが示唆された。★

★【0045】

【発明の効果】上述したように、本発明における伸長性の向上した変異型逆転写酵素は、42～60℃の間で野生型および従来のRNaseH欠失型の逆転写酵素に比べて、伸長性が向上しており、完全長cDNAを合成するのに適した酵素である(図1参照)。

【0046】

【配列表】

配列番号1

配列の長さ: 672 (アミノ酸)

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

MET	Thr	Leu	Asn	Ile	Glu	Asp	Glu	His	Arg	Leu	His	Glu	Thr	Ser	Lys
1				5						10				15	
Glu	Pro	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Trp	Leu	Ser	Asp	Phe	Pro	Gln
				20						25				30	
Ala	Trp	Ala	Glu	Thr	Gly	Gly	MET	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
				35						40				45	
Leu	Ile	Ile	Pro	Leu	Lys	Ala	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Ser	Ile	Lys	Gln
				50						55				60	
Tyr	Pro	MET	Ser	Gln	Glu	Ala	Arg	Leu	Gly	Ile	Lys	Pro	His	Ile	Gln
				65						70				75	
Arg	Leu	Leu	Asp	Gln	Gly	Ile	Leu	Val	Pro	Cys	Gln	Ser	Pro	Trp	Asn
				85						90				95	
Thr	Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Thr	Asn	Asp	Tyr	Arg	Pro

11

	100		105		110										
Val	Gln	Asp	Leu	Arg	Glu	Val	Asn	Lys	Arg	Val	Glu	Asp	Ile	His	Pro
	115						120				125				
Thr	Val	Pro	Asn	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	His
	130						135				140				
Gln	Trp	Tyr	Thr	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asp	Ala	Phe	Phe	Cys	Leu	Arg
145					150					155				160	
Leu	His	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro	Leu	Phe	Ala	Phe	Glu	Trp	Arg	Asp	Pro
				165						170				175	
Glu	MET	Gly	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Thr	Trp	Thr	Arg	Leu	Pro	Gln	Gly
	180								185				190		
Phe	Lys	Asn	Ser	Pro	Thr	Leu	Phe	Asp	Glu	Ala	Leu	His	Arg	Asp	Leu
	195							200					205		
Ala	Asp	Phe	Arg	Ile	Gln	His	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Leu	Gln	Tyr	MET
	210						215						220		
Asp	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	Cys	Gln	Gln	Gly
225					230						235			240	
Thr	Arg	Ala	Leu	Leu	Gln	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu	Gly	Tyr	Arg	Ala	Ser
					245						250			255	
Ala	Lys	Lys	Ala	Gln	Ile	Cys	Gln	Lys	Gln	Val	Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr
				260						265				270	
Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Gln	Arg	Trp	Leu	Thr	Glu	Ala	Arg	Lys	Glu	Thr
	275								280					285	
Val	MET	Gly	Gln	Pro	Thr	Pro	Lys	Thr	Pro	Arg	Gln	Leu	Arg	Glu	Phe
	290						295							300	
Leu	Gly	Thr	Ala	Gly	Phe	Cys	Arg	Leu	Trp	Ile	Pro	Gly	Phe	Ala	Glu
305					310						315			320	
MET	Ala	Ala	Pro	Leu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Lys	Thr	Gly	Thr	Leu	Phe	Asn
					325						330			335	
Trp	Gly	Pro	Asp	Gln	Gln	Lys	Ala	Tyr	Gln	Glu	Ile	Lys	Gln	Ala	Leu
				340						345				350	
Leu	Thr	Ala	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Pro	Asp	Leu	Thr	Lys	Pro	Phe	Glu
	355								360					365	
Leu	Phe	Val	Asp	Glu	Lys	Gln	Gly	Tyr	Ala	Lys	Gly	Val	Leu	Thr	Gln
				370						375				380	
Lys	Leu	Gly	Pro	Trp	Arg	Arg	Pro	Val	Ala	Tyr	Leu	Ser	Lys	Lys	Leu
385					390						395			400	
Asp	Pro	Val	Ala	Ala	Gly	Trp	Pro	Pro	Cys	Leu	Arg	MET	Val	Ala	Ala
				405							410			415	
Ile	Ala	Val	Leu	Thr	Lys	Asp	Ala	Gly	Lys	Leu	Thr	MET	Gly	Gln	Pro
				420						425				430	
Leu	Val	Ile	Leu	Ala	Pro	His	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Pro
	435									440				445	
Pro	Asp	Arg	Trp	Leu	Ser	Asn	Ala	Arg	MET	Thr	His	Tyr	Gln	Ala	Leu
	450									455				460	
Leu	Leu	Asp	Thr	Asp	Arg	Val	Gln	Phe	Gly	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Asn
465					470						475			480	
Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Glu	Gly	Leu	Gln	His	Asn	Cys
					485						490			495	
Leu	Asp	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	His	Gly	Thr	Arg	Pro	Asp	Leu	Thr	Asp

13

	500	505	510
Gln Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser			
515	520	525	
Leu Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu			
530	535	540	
Thr Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln			
545	550	555	560
Arg Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys MET Ala Glu Gly			
565	570	575	
Lys Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala			
580	585	590	
His Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu			
595	600	605	
Gly Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala			
610	615	620	
Leu Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln			
625	630	635	640
Lys Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg MET Ala Asp Gln Ala			
645	650	655	
Ala Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu			
660	665	670	

【0047】

配列番号2

配列の長さ: 2019

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源: Molony Murine Leukemia Virus

配列

```

ATG ACC CTA AAT ATA GAA GAT GAG CAT CGG CTA CAT GAG ACC TCA AAA 48
GAG CCA GAT GTT TCT CTA GGG TCC ACA TGG CTG TCT GAT TTT CCT CAG 96
GCC TGG GCG GAA ACC GGG GGC ATG GGA CTG GCA GTT CGC CAA GCT CCT 144
CTG ATC ATA CCT CTG AAA GCA ACC TCT ACC CCC GTG TCC ATA AAA CAA 192
TAC CCC ATG TCA CAA GAA GCC AGA CTG GGG ATC AAG CCC CAC ATA CAG 240
AGA CTG TTG GAC CAG GGA ATA CTG GTA CCC TGC CAG TCC CCC TGG AAC 288
ACG CCC CTG CTA CCC GTT AAG AAA CCA GGG ACT AAT GAT TAT AGG CCT 336
GTC CAG GAT CTG AGA GAA GTC AAC AAG CGG GTG GAA GAC ATC CAC CCC 384
ACC GTG CCC AAC CCT TAC AAC CTC TTG AGC GGG CTC CCA CCG TCC CAC 432
CAG TGG TAC ACT GTG CTT GAT TTA AAG GAT GCC TTT TTC TGC CTG AGA 480
CTC CAC CCC ACC AGT CAG CCT CTC TTC GCC TTT GAG TGG AGA GAT CCA 528
GAG ATG GGA ATC TCA GGA CAA TTG ACC TGG ACC AGA CTC CCA CAG GGT 576
TTC AAA AAC AGT CCC ACC CTG TTT GAT GAG GCA CTG CAC AGA GAC CTA 624
GCA GAC TTC CGG ATC CAG CAC CCA GAC TTG ATC CTG CTA CAG TAC ATG 672
GAT GAC TTA CTG CTG GCC GCC ACT TCT GAG CTA GAC TGC CAA CAA GGT 720
ACT CGG GCC CTG TTA CAA ACC CTA GGG AAC CTC GGG TAT CGG GCC TCG 768
GCC AAG AAA GCC CAA ATT TGC CAG AAA CAG GTC AAG TAT CTG GGG TAT 816
CTT CTA AAA GAG GGT CAG AGA TGG CTG ACT GAG GCC AGA AAA GAG ACT 864
GTG ATG GGG CAG CCT ACT CCG AAG ACC CCT CGA CAA CTA AGG GAG TTC 912
CTA GGG ACG GCA GGC TTC TGT CGC CTC TGG ATC CCT GGG TTT GCA GAA 960

```


15

16

ATG GCA GCC CCC TTG TAC CCT CTC ACC AAA ACG GGG ACT CTG TTT AAT 1008
 TGG GGC CCA GAC CAA CAA AAG GCC TAT CAA GAA ATC AAG CAA GCT CTT 1056
 CTA ACT GCC CCA GCC CTG GGG TTG CCA GAT TTG ACT AAG CCC TTT GAA 1104
 CTC TTT GTC GAC GAG AAG CAG GGC TAC GCC AAA GGT GTC CTA ACG CAA 1152
 AAA CTG GGA CCT TGG CGT CGG CCG GTG GCC TAC CTG TCC AAA AAG CTA 1200
 GAC CCA GTA GCA GCT GGG TGG CCC CCT TGC CTA CGG ATG GTA GCA GCC 1248
 ATT GCC GTA CTG ACA AAG GAT GCA GGC AAG CTA ACC ATG GGA CAG CCA 1296
 CTA GTC ATT CTG GCC CCC CAT GCA GTA GAG GCA CTA GTC AAA CAA CCC 1344
 CCC GAC CGC TGG CTT TCC AAC GCC CGG ATG ACT CAC TAT CAG GCC TTG 1392
 CTT TTG GAC ACG GAC CGG GTC CAG TTC GGA CCG GTG GTA GCC CTG AAC 1440
 CCG GCT ACG CTG CTC CCA CTG CCT GAG GAA GGG CTG CAA CAC AAC TGC 1488
 CTT GAT ATC CTG GCC GAA GCC CAC GGA ACC CGA CCC GAC CTA ACG GAC 1536
 CAG CCG CTC CCA GAC GCC GAC CAC ACC TGG TAC ACG GAT GGA AGC AGT 1584
 CTC TTA CAA GAG GGA CAG CGT AAG GCG GGA GCT GCG GTG ACC ACC GAG 1632
 ACC GAG GTA ATC TGG GCT AAA GCC CTG CCA GCC GGG ACA TCC GCT CAG 1680
 CGG GCT GAA CTG ATA GCA CTC ACC CAG GCC CTA AAG ATG GCA GAA GGT 1728
 AAG AAG CTA AAT GTT TAT ACT AAT AGC CGT TAT GCT TTT GCT ACT GCC 1776
 CAT ATC CAT GGA GAA ATA TAC AGA AGG CGT GGG TTG CTC ACA TCA GAA 1824
 GGC AAA GAG ATC AAA AAT AAA GAC GAG ATC TTG GCC CTA CTA AAA GCC 1872
 CTC TTT CTG CCC AAA AGA CTT AGC ATA ATC CAT TGT CCA GGA CAT CAA 1920
 AAG GGA CAC AGC GCC GAG GCT AGA GGC AAC CGG ATG GCT GAC CAA GCG 1968
 GCC CGA AAG GCA GCC ATC ACA¹ GAG ACT CCA GAC ACC TCT ACC CTC CTC 2016
 TAG 2019

【0048】配列番号3

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド

配列

CTG TGA CTG GTG ACG CGT CAA CCA AGT

【0049】配列番号4

配列の長さ: 34

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド

配列

GCT TTT CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT C

【0050】配列番号5

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド

配列

GTA AGT CAT CCA TGT ACT GTA GCA G

【0051】配列番号6

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸 (DNA)

*鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド

配列

CAT AAC GGC TAT TAG TAT AAA CAT TTA G

【0052】配列番号7

30 配列の長さ: 38

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド

配列

TTC AGT TAC ATT ATG ATT TAC AGT TTA ATA CTC GGT GG

【0053】配列番号8

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸 (DNA)

40 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド

配列

CCT ACT GGA GCA ATA AAG TTT GAA G

【0054】配列番号9

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

*50 配列の種類: 合成オリゴヌクレオチド

(10)

特開2000-139457

17

18

配列

CCA TCT ACG ATG TCA GTA CTT CC

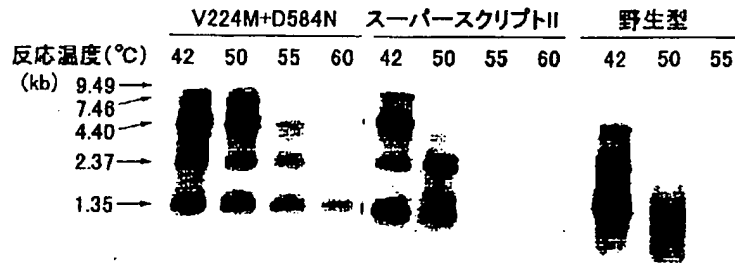
ースクリプトIIおよびV224M+D584NのcDNA合成反応における伸長性を示した図である。

【図面の簡単な説明】

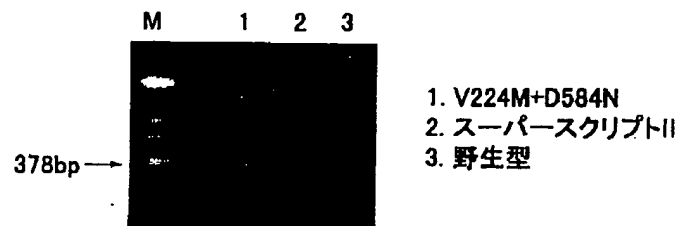
【図2】 ジストロフィンmRNAを標的とした、RT-PCR増幅産物の電気泳動図である。

【図1】 野生型、従来のRNaseH欠失型、スーパ

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷
)

識別記号

F I

テ-マコード' (参考)

(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:92)

Z N A

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

F タ-ム(参考) 4B024 BA10 CA04 DA06 HA08
4B050 CC03 DD01 FF04E FF05E
FF11E FF14E
4B065 AA26X AA95Y AB01 BA02
CA29 CA44 CA60

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] this invention relates to the synthetic method of cDNA which used this reverse transcriptase for the manufacture method row of this reverse transcriptase that uses the gene and this gene which carry out the cord of the reverse transcriptase excellent in extensibility, especially the extensibility in a pyrosphere, and this reverse transcriptase.

[0002]

[Description of the Prior Art] About the reverse transcriptase of a retrovirus especially MORONI mouse leukemia viruses (MMLV) and a Homo sapiens acquired immunity insufficient virus (HIV), and the TORI bone marrow **** virus (AMV) origin, many researches are made from the former, and various functions and a property are known. In addition, RNA is used for construction of much molecular biology-technique, for example, a cDNA library, radiographic-PCR, etc. with the characteristic property in which a complementary DNA (cDNA) is compoundable to this as mold. Since the base sequence of mRNA is reflecting the amino acid sequence of the protein discovered, the meaning of the analysis is very large when knowing the function of a gene product.

[0003] It is known that many of reverse transcriptase of the retrovirus origin reported until now, on the other hand, has the activity which decomposes RNA of a two DNA-RNA hybrid chain, i.e., RNaseH activity. In case existence of this activity compounds cDNA, it disassembles the mold of mold-primer complex, and since mold-primer complex is dissociated when the decomposition position is close to 3' edge of a primer, the result that extensibility falls is caused. In order to eliminate such a problem, the reverse transcriptase which does not have RNaseH activity substantially has been developed.

[0004] It is known from functional analyses the homology [reverse transcriptase / of the MORONI mouse-leukemia-viruses (MMLV) origin] of the amino acid sequence, and various that C terminus side about 200 residues of the protein are the domains which bear RNaseH activity (Reversetranscriptase, the 135-162nd page of Cold Spring Harbor Monograph, 1993). The deletion type which deleted the amino acid of a RNaseH domain is able to receive from a life technology company from Toyobo now with a tradename called Superscript II in the point mutation type which carried out the deletion of the function by substitution of amino acid as reverse transcriptase of the MMLV origin which carried out the deletion of the RNaseH activity.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, even if it carries out with these reverse transcriptase, cDNA of perfect length may be unacquirable. Or combination of reverse transcriptase

is checked as the reason for the higher order structure resulting from the array of template RNA, template RNA and the nucleotide which is not complementary are incorporated by the three-dash terminal of the DNA strand on the way of composition, and it considers that an extension reaction is checked. Therefore, it waited eagerly for development of the high reverse transcriptase of the extensibility which can react in a higher temperature region rather than the conventional thing.
[0006]

[Means for Solving the Problem] Although the amino acid sequence of reverse transcriptase reported until now has some common saved areas, the array expressed with Tyr(tyrosine)-X-Asp(aspartic acid)-Asp (aspartic acid) also in it exists in almost all reverse transcriptase. There are various variations about X and it is a methionine etc. in a MORONI mouse-leukemia-viruses (MMLV) cauliflower mosaic virus (CAMV) by the valine, the Homo sapiens acquired immunity insufficient virus (HIV), and the RAUSUSARU comber virus (RSV). Functioning as a bonding site of a divalent metallic ion is known from crystal structure analysis etc., and this field has played the role important for the manifestation of enzyme activity (the 15th volume of Structure, the 879-892nd page, 1995).

[0007] The report that the kind of amino acid of X was further recently participating in the extensibility of the reverse transcriptase of the HIV origin greatly was made. That is, although the wild type of the reverse transcriptase of the HIV origin has a methionine in the position of X, if this is changed into a valine or threonine, the phenomenon in which the capacity which elongates 3' edge of the extension (it acted as mistake in corporation) chain with which the nucleotide which was mistaken to mold was incorporated declines is reported (Nucleic Acids Research the 25th volume, the 3212-3217th page, 1997).

[0008] In view of the above-mentioned situation, wholeheartedly, this invention persons found out that extensibility and thermal resistance could be improved as compared with this reverse transcriptase of a wild type by adding improvement by point mutation to the reverse transcriptase of the MMLV origin as a result of examination, and reached this invention. Reactivity is made to improve among scarce 60 degrees C conventionally from 42 degrees C whose extensibility of cDNA composition is the conventional reaction temperature fields by adding the amino acid variation which replaces the 584th aspartic acid of the reverse transcriptase of the MMLV origin by the asparagine as the concrete example, and adding the amino acid variation which replaces the 224th valine equivalent to X of a further above-mentioned saved area by the methionine to what carried out the deletion of the RNaseH activity.

[0009] That is, this invention consists of the following composition.

- (1) Variant reverse transcriptase characterized by extensibility improving as compared with a wild type.
- (2) Variant reverse transcriptase of (1) which improved in the range whose extensibility is 42-60 degrees C.
- (3) (1) or (2) variant reverse transcriptase which do not have RNaseH activity substantially.
- (4) Tyr Met Asp Asp One variant reverse transcriptase of (1) - (3) including the amino acid sequence expressed.
- (5) One variant reverse transcriptase of (1) - (4) originating in a MORONI mouse leukemia virus (MMLV).
- (6) Variant reverse transcriptase of (5) which consists of an amino acid sequence indicated by the array number 1.
- (7) The DNA fragment characterized by containing the base sequence which carries out the code of the amino acid sequence indicated by the array number 1.
- (8) The DNA fragment of (7) containing the nucleotide sequence indicated by the array number 2.

The DNA recombination vector characterized by inserting the DNA fragment of (9), (7), or (8) in a vector.

The recombination host cell characterized by carrying out a transformation using the DNA recombination vector of (10) and (9).

(11) The recombination host cell of (10) whose a host cell is *Escherichia coli* (*Escherichia coli*).

The manufacture method of the variant reverse transcriptase characterized by cultivating the recombination host of (12), (10), or (11), and extracting reverse transcriptase from culture medium.

(13) -- (1) - (6) -- the synthetic method of cDNA characterized by using RNA as mold, using one of variant reverse transcriptase

[0010]

[Embodiments of the Invention] The variant reverse transcriptase in this invention is characterized by the extensibility of cDNA composition improving as compared with a wild type. It improves before 60 degrees C which was especially conventionally [42 degrees C which is the conventional reaction temperature field in the range of 42-60 degrees C to] lacking in reactivity. Here, the extensibility of reverse transcriptase means the capacity which compounds longer cDNA. Moreover, variant reverse transcriptase means what is obtained by performing variation operation of the substitution of amino acid, a deletion, insertion, etc. to wild-type reverse transcriptase.

[0011] The variant reverse transcriptase in this invention does not have RNaseH activity substantially suitably. Here, if it does not have RNaseH activity substantially, the thing of ten to six or less units of RNaseH activity per reverse transcription activity 1 unit will be said.

[0012] As a suitable example of the reverse transcriptase in this invention, it is Tyr Met Asp Asp.

The amino acid sequence expressed is included. The reverse transcriptase which has this amino acid sequence can be obtained by introducing amino acid variation into the reverse transcriptase of for example, the MMLV origin. What method may be used as long as introduction of amino acid variation is the method which this contractor can make in this invention. For example, the site-directed mutagenesis method is mentioned (Methods Enzymol. the 154th volume, the 382nd page, 1987).

[0013] The DNA fragment of this invention is DNA which carries out the code of the variant reverse transcriptase which improved, and an example of this DNA fragment contains the base sequence which carries out the code of the amino acid sequence indicated by the array number 1. Moreover, such DNA contains the base sequence indicated array number 2 or its part.

[0014] Furthermore, the DNA recombination vector of this invention is obtained by inserting the above-mentioned DNA fragment in a vector. If this vector enables cloning of variant reverse transcriptase, and a manifestation, what thing may be used, for example, a phage and a plasmid will be mentioned. As a plasmid, pUC118, pUC18, pBR322, pBluescript, pLED-M1, p73 and pGW7, pET3a, pET8c, etc. are mentioned. On the other hand, lambdagt11, lambdaZAPII, etc. are mentioned as a phage.

[0015] Moreover, the recombination host cell of this invention is obtained by carrying out the transformation of the host cell using the above-mentioned DNA recombination vector. As this host cell, *Escherichia coli*, yeast, etc. mention and especially *Escherichia coli* has desirable ****. As *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (*Escherichia coli*) DH5alpha, jump on minus109 and HB101, XL1Blue, PR1, HS641 (DE3), BL21 (DE3), etc. are mentioned, for example. That is, in this invention, the gene which carries out the code of the variant reverse transcriptase which improved is inserted in the above-mentioned vector, it considers as a DNA recombination vector, and the transformation of the host cell is further carried out in this recombination expression vector.

[0016] Moreover, the manufacture method of the variant reverse transcriptase in this invention

cultivates the above-mentioned recombination host cell, and is characterized by extracting reverse transcriptase from culture medium. Conditions follow the culture-medium row used for cultivation of this recombination host cell at a conventional method. This variant reverse transcriptase can be obtained by cultivating the Escherichia coli in which the transformation was carried out by the plasmid which contains the variant reverse transcriptase gene which improved as an example for example, in TB culture medium.

[0017] As the refining method of the above-mentioned variant reverse transcriptase, after assembling (a) recombination host, it crushes, a cell extract is prepared and the process which removes the impure protein of (b) host cell origin is included, for example. The variant reverse transcriptase which improved separates and collects host-bacterium objects from culture medium in centrifugal separation etc. after cultivation by the culture medium. After re-suspending this biomass in the buffer solution, a biomass is crushed by ultrasonication, dynomill French PURENSU, etc.

[0018] Subsequently, a column chromatography is carried out and the variant reverse transcriptase which improved is collected. A cation exchanger, for example, a phosphocellulose, a hydrophobic adsorbent, for example, butyl sepharose, or affinity adsorbent heparin sepharose of a column chromatography is desirable.

[0019] The molecular weight of the variant reverse transcriptase which improved is about 74 KDa(s) preferably.

[0020] By using the variant reverse transcriptase in this invention, RNA is used as mold and it makes it possible to compound longer cDNA. Although the length of compoundable cDNA changes with the reaction conditions etc. using the variant reverse transcriptase in this invention, extension of at least 9.4 or more kbs is possible, and extension of 14 or more kbs which has not been realized if the conventional reverse transcriptase was used according to conditions is also enabled. When the case where the reverse transcriptase of the wild type conventional on the same conditions is used when the variant reverse transcriptase of this invention is used, and its extensibility are contrasted, the extensibility more than double precision can be increased.

[0021]

[Example] Hereafter, an example explains this invention concretely.

[0022] Example 1 The introductory wild-type MMLV reverse transcriptase manifestation plasmid pRT 30-2 of the point mutation to MMLV reverse transcriptase carried out sale-in-lots acquisition from Professor Columbia University and GOFFU.

[0023] Introduction of point mutation was performed according to directions of a description using the transformer kit (Clontech make). Two sorts of restriction enzyme selection primers and two sorts of variation introduction primers (array numbers 3, 4, 5, and 6) were compounded. The array number 3 is a primer which changes the ScaI part in a beta lactamase gene into MluI. The array number 4 is a primer which changes into ScaI the MluI part in the beta lactamase gene changed above. The array number 5 is a primer (that is, the 224th valine of an amino acid sequence is changed into a methionine) which changes the 670th guanine in a MMLV reverse transcriptase gene into an adenine. The array number 6 is a primer (that is, the 584th aspartic acid of an amino acid sequence is changed into an asparagine) which changes the 1750th guanine in a MMLV reverse transcriptase gene into an adenine.

[0024] It is 1mM about each primer 200pmol. ATP, five units It incubated for 30 minutes at 37 degrees C among the kinase buffer containing a polynucleotide kinase (Toyobo make), and the five prime end was phosphorylated. Then, it incubated for 15 minutes at 75 degrees C, and the polynucleotide kinase was made to deactivate.

[0025] pRT 30-2 The solution of 0.1microg and 20microl which contains 10pmol(s) and annealing

buffer 2microl of the above-mentioned kit appending for the primer of the array numbers 3 and 6 which phosphorized the five prime end, respectively was ice-cooled for 5 minutes, immediately after incubating for 3 minutes at 100 degrees C.

[0026] After adding distilled water 5microl, synthesis buffer 3microl of kit appending, T4 ligase 1microl, and 1micro [of T4 DNA polymerase] l to this and incubating at 37 degrees C for 1 hour, it incubated for 15 minutes at 75 degrees C, and the enzyme was made to deactivate. H buffer 3microl and ScaI 20 unit were added to this, and it incubated at 37 degrees C for 2 hours.

[0027] among these, competent [71 to 18 stocks of Escherichia coli BMH] in 1microl -- after ice-cooling for 30 minutes in addition to cell 100microl, it incubated for 30 seconds at 42 degrees C, and the SOC culture medium of 900microl was added and it incubated at 37 degrees C for 1 hour 5ml of LB culture media which contain a 50microg [/ml] ampicillin in this was added, and it incubated at 37 degrees C overnight.

[0028] the law from the biomass obtained as mentioned above -- the plasmid was extracted by the method, ScaI 10 unit and H buffer 2microl were added to 50ng(s) among those, the whole quantity was set to 20microl, and it incubated at 37 degrees C for 2 hours 2micro of this reaction mixture l -- an Escherichia coli DH5alpha competent cell -- in addition, a law -- the transformation was carried out according to the method

[0029] the law after suspending the colony obtained as mentioned above in 2.5ml of LB culture media and cultivating it overnight -- the plasmid was extracted according to the method This plasmid checked the base sequence by Sanger method about what is cut by MluI, and plasmid pD584N from which the 1747th guanine in a MMLV reverse transcriptase gene is changed into the adenine (that is, the 584th aspartic acid of an amino acid sequence is changed into the asparagine) was acquired.

[0030] The 670th guanine in a MMLV reverse transcriptase gene acquired like the above plasmid pV224M changed into the adenine (that is, the 223rd valine of an amino acid sequence is changed into the methionine) using the primer of the array number 5.

[0031] Moreover, the plasmid pDNVM from which the primer of the array numbers 4 and 5 is used based on pD584N, and the 1750th guanine is changed into an adenine (that is, the 584th aspartic acid of an amino acid sequence is changed into the asparagine), and the 670th guanine is changed into the adenine (that is, the 224th valine of an amino acid sequence is changed into the methionine) was acquired.

[0032] example 2 it was obtained in the production example 1 of a transformant -- each -- after adding plasmid 1ng to 5alpha 100micro of Escherichia coli DH 1 and ice-cooling for 30 minutes, it incubated for 30 seconds at 42 degrees C, and the SOC culture medium of 900microl was added and it incubated at 37 degrees C for 1 hour This was incubated at 37 degrees C overnight on LB agar medium containing a 50microg [/ml] ampicillin, and the transformant was obtained.

[0033] Example 3 Each transformant obtained in the cultivation example 2 of a transformant was suspended in 100ml of TB culture media containing a 100microg [/ml] ampicillin, and it incubated at 37 degrees C overnight. It collected by carrying out at-long-intervals heart separation of the obtained biomass by 12,000 revolutions per minute for 5 minutes.

[0034] Example 4 The following operations were performed about each biomass obtained in the refining example 3 of MMLV reverse transcriptase. 10g of biomasses was suspended in buffer 1 (20mM tris-hydrochloric-acid (pH 7.5), 5mM EDTA, 5mM mercaptoethanol, 100mM sodium chloride) 20ml. This was crushed by the ultrasonic crusher and precipitation was separated by carrying out at-long-intervals heart separation by 12000 revolutions per minute for 10 minutes. 0.4ml of polyethyleneimine solutions was added 0.6% to the obtained supernatant liquid, and it stirred for 30 minutes to it. By carrying out at-long-intervals heart separation of this by 12000 revolutions per

minute for 10 minutes, precipitation was separated and supernatant liquids were collected. 4.56g of ammonium sulfates was added to this liquid, and it stirred for 30 minutes. Precipitation was separated and collected by carrying out at-long-intervals heart separation of this by 12000 revolutions per minute for 10 minutes.

[0035] The obtained precipitation was dissolved in buffer 2(20mM tris-hydrochloric-acid (pH 7.5), 0.1mM EDTA, 5mM mercaptoethanol, 50mM sodium chloride, 10% glycerol)5ml, and it dialyzed to the 100ml buffer 2. This was charged in the DEAE sepharose column (5ml), and non-adsorbing fractions were collected. This is charged in a phosphocellulose column (5ml), and they are after washing and 0-500mM with the 10ml buffer 2. Gradient buffer 2 of NaCl It was eluted in 40ml.

[0036] The fraction which does not have RNaseH activity among the obtained fractions including reverse transcriptase activity was pooled. Subsequently, a heparin sepharose column (3ml) is presented with this, and it is 0-1M. It was eluted with the gradient buffer 2 of NaCl, and the fractions containing reverse transcriptase activity were collected. By the above operation, the 10mg protein in which an almost single band is shown in SDS-PAGE was obtained. Protein obtained from the biomass which has V224M and pDNVM in the protein obtained from the biomass which has D584N and pV224M in the protein obtained from the biomass which has pD584N was set to V224 M+D584N.

[0037] Example 5 The constituent of the comparison following of cDNA composition extension capacity was prepared.

Distilled water 12microl5x1 st strand synthesis buffer 2.0microl (product made from LifeTech) 10mM(s) dNTP 2.0microl(alpha-32P) dTTP (370kBq/mul) 1.0microlRNA Ladder 0.5microl (product made from LifeTech)

100pmol/mul (dT) 30 1.0microlRNase inhibitor (20units/mul) 0.5microl reverse transcriptase (10units/mul) 1.0microl [0038] Reverse transcriptase used V223 M+D583N obtained in a wild type, a RNaseH deletion type (Toyobo make), SuperscriptII (product made from LifeTech), and the example 4 for comparison. This was incubated for 1 hour at 42 degrees C, 50 degrees C, 55 degrees C, and 60 degrees C. The stop solution (20mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, 0.05%BPB, 20% glycerol) was 4microl Added, and electrophoresis was performed after the reaction end using agarose gel. Autoradiography was performed after drying gel with a gel dryer. Consequently, as for what compounded by V224 M+D584N, compared with other enzymes, extension of longer cDNA was observed between 42 degrees C and 60 degrees C.

[0039] Example 6 It is known that mRNA of the comparison HITOJI strike lophine of the cDNA composition extension capacity by radiographic-PCR has the length of about 14 kb(s). The oligonucleotide shown in the array number 7 is designed so that it may combine with 3' edge of this mRNA complementary. After performing a cDNA composition reaction using this primer, PCR was performed using the primer set shown in the array numbers 8 and 9. This primer set is designed so that 5' **** 400bp of mRNA may be amplified, and if cDNA composition has reached to 5' edge, it can check amplification.

[0040] The cDNA composition reaction prepared the following reaction mixture, and was performed by incubating at 42 degrees C for 30 minutes.

[0041]

Distilled water 11microl5x1 st strand synthesis buffer 4.0microl (Toyobo make) 10mM(s) dNTP 2.0microl Homo sapiens skeletal muscle polyA+RNA(0.1microg/mul) 1.0microl (product made from CloneTech)

Primer array number 7 (10pmol/mul) 1.0microl reverse transcriptase (100units/mul) 1.0microl [0042] PCR prepared the following reaction mixture and it carried out by repeating at 98 degrees C and

repeating the heat cycle for 30 seconds 30 times at 68 degrees C for 30 seconds.

[0043]

Distilled water 7.0microl10xKOD dash buffer 2.0microl (Toyobo make)

cDNA composition reaction mixture 8.0microl Primer array number 8 (10pmol/mul) 1.0microl primer array number 9 (10pmol/mul) 1.0microlKOD dash (2.5units/mul) 1.0microl (Toyobo make)

[0044] Agarose gel electrophoresis was presented with 5micro of reaction mixture I after the heat cycle end, and the amplification product was detected. Consequently, as for what performed cDNA composition by V224 M+D584N as shown in drawing 2 , the amplification product was checked, and although it was suggested that cDNA of about 14 kb(s) is compounded, an amplification product was not observed in the wild type and Superscript II. It was suggested from this that extension of longer cDNA is possible for V224 M+D584N compared with these enzymes.

[0045]

[Effect of the Invention] As mentioned above, it is an enzyme suitable for extensibility of variant reverse transcriptase which improved improving compared with wild-type and conventional RNaseH deletion type reverse transcriptase among 42-60 degrees C, and compounding the perfect length cDNA (refer to drawing 1).

[0046]

[Layout Table]

The length of array number 1 array: 672 (amino acid)

mold [of an array]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- a protein array
 MET Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys 1 5 10 15 Glu Pro Asp Val Ser
 Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln 20 25 30 Ala Trp Ala Glu Thr Gly Gly MET Gly Leu
 Ala Val Arg Gln Ala Pro35 40 45 Leu Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser ThrPro Val Ser Ile Lys Gln 50
 55 60 Tyr Pro MET Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln 65 70 7580 Arg Leu Leu
 Asp Gln GlyIle Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn 85 9095 Thr Pro LeuLeu Pro ValLys Lys Pro
 Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro 100 105 110 Val Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp
 Ile His Pro 115 120 125 Thr Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu LeuSer Gly Leu Pro Pro Ser His 130 135
 140 Gln Trp Tyr Thr Val Leu Asp LeuLys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg 145 150 155 160 Leu His
 Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro 165 170 175 Glu MET Gly Ile Ser Gly
 Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly 180 185 190 Phe Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu
 Ala Leu His Arg Asp Leu 195 200 205 Ala Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln
 Tyr MET 210 215 220 Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly 225
 230 235 240 Thr Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser 245 250 255 Ala
 Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr 260 265 270 Leu Leu Lys Glu Gly
 Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr 275 280 285 Val MET Gly Gln Pro Thr Pro Lys
 Thr-Pro-Arg-Gln-Leu Arg Glu Phe 290 295 300 Leu-Gly-Thr-Ala-Gly Phe Cys Arg Leu
 Trp-Ile-Pro-Gly-Phe-Ala-Glu 305 310 315 320 MET Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly
 Thr Leu Phe Asn 325330 335 Trp Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu
 340 345 350 Leu Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu 355 360 365 Leu
 Phe Val Asp Glu LysGln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln 370 375 380 Lys Leu Gly Pro Trp
 Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu 385 390 395 400 Asp Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro
 Pro Cys Leu Arg MET Val Ala Ala 405410 415 Ile Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr
 MET Gly Gln Pro 420 425 430 Leu Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val GluAla Leu Val Lys Gln Pro
 435 440 445 Pro Asp Arg Trp LeuSer Asn Ala Arg MET Thr His Tyr Gln Ala Leu 450 455 460 Leu
 Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn 465 470 475480 Pro Ala Thr Leu
 LeuProLeu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys 485 490 495 Leu Asp Ile Leu Ala Glu Ala His

Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp 500 505 510 Gln Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr
Asp Gly Ser Ser 515 520 525 Leu Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu
530 535 540 Thr Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln 545 550 555 560
Arg Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys MET Ala Glu Gly 565 570 575
Lys-Lys-Leu-Asn-Val Tyr Thr Asn Ser Arg-Tyr-Ala-Phe-Ala-Thr-Ala 580 585 590
His-Ile-His-Gly-Glu Ile Tyr Arg Arg Arg-Gly-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu 595 600 605 Gly Lys Glu Ile Lys
Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala 610 615 620 Leu Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile
His Cys Pro Gly His Gln 625 630 635 640 Lys Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg MET Ala
Asp Gln Ala 645 650 655 Ala Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu 660
665 670 [0047]

The mold of the length: 2019 array which is array number 2 array: Nucleic acid (DNA)

number [of chains]: -- 2 chain topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- cDNA origin: --

Molony Murine Leukemia Virus array ATG ACC CTA AAT ATA GAA GAT GAG CAT CGG
CTA CAT GAG ACC TCA AAA 48 GAG CCA GAT GTT TCT CTA GGG TCC ACA TGG CTG
TCT GAT TTT CCT CAG 96 GCC TGG GCG GAA ACC GGG GGC ATG GGA CTG GCA GTT
CGC CAA Greenwich civil time CCT 144 CTG ATC ATA CCT CTG AAA GCA ACC TCT ACC
CCC GTG TCC ATA AAA CAA 192 TAC CCC ATG TCA CAA GAA GCC AGA CTG GGG
ATC AAG CCCCAC ATA CAG 240 AGA CTG TTG GAC CAG GGA ATA CTG GTA CCC
TGC CAG TCC CCC TGG AAC 288 ACG CCC CTG CTACCC GTT AAG AAA CCA GGG
ACT AAT GAT TAT AGG CCT 336 GTC CAG GAT CTG AGA GAA GTC AAC AAG CGG
GTG GAA GAC ATC CAC CCC 384 ACC GTG CCC AAC CCT TAC AAC CTC TTG AGC
GGG CTC CCA CCG TCC CAC 432 CAG TGG TACACT GTG CTT GAT TTA AAG GAT GCC
TTT TTC TGC CTG AGA 480 CTC CAC CCC ACC AGT CAG CCT CTC TTC GCC TTT GAG
TGG AGA GAT CCA 528 GAG ATG GGA ATC TCA GGA CAA TTG ACC TGG ACC AGA
CTC CCA CAG GGT 576 TTC AAA AAC AGT CCC ACC CTG TTT GAT GAG GCA CTG
CAC AGA GAC CTA 624 GCA GACTTC CGG ATC CAG CAC CCA GAC TTG ATC CTG CTA
CAG TAC ATG 672 GAT GAC TTA CTG CTG GCC GCC ACT TCT GAG CTA GAC TGC
CAA CAA GGT 720 ACT CGG GCC CTGT TA CAA ACC CTA GGG AAC CTC GGG TAT
CGG GCC TCG 768 GCC AAG AAA GCC CAA ATT TGC CAG AAA CAG GTC AAG TAT
CTG GGG TAT 816 CTTCTA AAA GAG GGT CAG AGA TGG CTG ACT GAG GCC AGA
AAA GAG ACT 864 GTG ATG GGG CAG CCT ACT CCG AAG ACC CCT CGA CAA CTA
AGG GAG TTC 912 CTA GGG ACG GCA GGC TTC TGT CGC CTC TGG ATC CCT GGG
TTT GCA GAA 960 ATG GCA GCC CCC TTG TAC CCT CTC ACC AAA ACG GGGACT CTG
TTT AAT 1008 TGG GGC CCA GAC CAA CAA AAG GCC TAT CAA GAA ATC AAG CAA
Greenwich civil time CTT 1056 CTA ACT GCC CCA GCC CTG GGG TTG CCA GAT TTG ACT
AAG CCC TTT GAA 1104 CTC TTT GTC GAC GAG AAG CAG GGC TAC GCC AAA GGT
GTC CTA ACG CAA 1152 AAA CTG GGA CCT TGG CGT CGG CCG GTG GCC TACCTG
TCC AAA AAG CTA 1200 GAC CCA GTA GCA Greenwich civil time GGG TGG CCC CCT
TGC CTA CGG ATG GTA GCA GCC 1248 ATT GCC GTA CTG ACA AAG GAT GCA GGC
AAG CTA ACC ATG GGA CAG CCA 1296 CTA GTC ATT CTG GCC CCC CAT GCA GTA
GAG GCA CTA GTC AAA CAA CCC 1344 CCC GAC CGC TGG CTT TCC AAC GCC
CGGATG ACT CAC TAT CAG GCC TTG 1392 CTT TTG GAC ACG GAC CGG GTC CAG
TTC GGA CCG GTG GTA GCC CTG AAC 1440 CCG Greenwich civil time ACG CTG CTC
CCA CTG CCT GAG GAA GGG CTG CAA CAC AAC TGC 1488 CTT GAT ATC CTG GCC
GAA GCC CAC GGA ACC CGA CCC GAC CTA ACG GAC 1536 CAG CCG CTC CCA GAC
GCC GAC CAC ACC TGG TAC ACG GATGGA AGC AGT 1584 CTC TTA CAA GAG GGA

CAG CGT AAG GCG GGA Greenwich civil time GCG GTG ACC ACC GAG 1632 ACC GAG
GTA ATC TG G-GCT-AAA-GCC-CTG-CCA GCC-GGG-ACA-TCC-GCT CAG 1680 CGG GCT
GAA CTG-ATA-GCA-CTC-ACC CAG-GCC-CTA-AAG-ATG GCA GAA GGT 1728 AAG
AAG-CTA-AAT-GTT-TAT ACT-AAT-AGC-CGT-TAT GCT-TTT-GCT-ACT-GCC 1776 CAT
ATC CAT GGA GAA-ATA-TAC-AGA-AGG CGT-GGG-TTG-CTC-ACA TCA GAA 1824 GGC
AAA GAG ATC AAA AAT AAA GAC GAG ATC TTG GCC CTACTA AAA GCC 1872 CTC
TTT CTG CCC AAA AGA CTT AGC ATA ATC CAT TGT CCA GGA CAT CAA 1920 AAG
GGA CAC AGC GCC GAG Greenwich civil time AGA GGC AAC CGG ATG Greenwich civil
time GAC CAA GCG 1968 GCC CGA AAG GCA GCC ATC ACA GAG ACT CCA GAC ACC
TCT ACC CTC CTC 2016TAG 2019[0048] The mold of the length:27 array which is array number
3 array: Nucleic acid (DNA)

number [of chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- synthetic
oligonucleotide array CTG TGA CTG GTG ACG CGT CAA CCA AGT [0049] The mold of the
length:34 array which is array number 4 array: Nucleic acid (DNA)

number [of chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- synthetic
oligonucleotide array Greenwich civil time TTT CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT
C [0050] The mold of the length:25 array which is array number 5 array: Nucleic acid (DNA)

number [of chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- synthetic
oligonucleotide array GTA AGT CAT CCA TGT ACT GTA GCA G [0051] The mold of the
length:28 array which is array number 6 array: Nucleic acid (DNA)

number [of chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- synthetic
oligonucleotide array CAT AAC GGC TAT TAG TAT AAA CAT TTA G [0052] The mold of the
length:38 array which is array number 7 array: Nucleic acid (DNA)

number [of chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- synthetic
oligonucleotide array TTC AGT TAC ATT ATG ATT TAC AGT TTA ATA CTC GGT GG [0053]
The mold of the length:25 array which is array number 8 array: Nucleic acid (DNA)

number [of chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- synthetic
oligonucleotide array CCT ACT GGA GCA ATA AAG TTT GAA G [0054] The mold of the
length:23 array which is array number 9 array: Nucleic acid (DNA)

number [of chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- synthetic
oligonucleotide array CCA TCT ACG ATG TCA GTA CTT CC

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Variant reverse transcriptase characterized by extensibility improving as compared with a wild type.

[Claim 2] Variant reverse transcriptase according to claim 1 which improved in the range whose extensibility is 42-60 degrees C.

[Claim 3] Variant reverse transcriptase according to claim 1 or 2 which does not have RNaseH activity substantially.

[Claim 4] Tyr Met Asp Asp Variant reverse transcriptase including the amino acid sequence expressed according to claim 1 to 3.

[Claim 5] Variant reverse transcriptase according to claim 1 to 4 originating in MORONI mouse leukemia viruses (MMLV).

[Claim 6] Variant reverse transcriptase according to claim 5 which consists of an amino acid sequence indicated by the array number 1.

[Claim 7] The DNA fragment characterized by containing the base sequence which carries out the code of the amino acid sequence indicated by the array number 1.

[Claim 8] The DNA fragment containing the nucleotide sequence indicated by the array number 2 according to claim 7.

[Claim 9] The DNA recombination vector characterized by inserting a DNA fragment according to claim 7 or 8 in a vector.

[Claim 10] The recombination host cell characterized by carrying out a transformation using a DNA recombination vector according to claim 9.

[Claim 11] The recombination host cell according to claim 10 whose host cell is Escherichia coli (Escherichia coli).

[Claim 12] The manufacture method of the variant reverse transcriptase characterized by cultivating a recombination host according to claim 10 or 11, and extracting reverse transcriptase from culture medium.

[Claim 13] The synthetic method of cDNA characterized by using RNA as mold, using variant reverse transcriptase according to claim 1 to 6.

[Translation done.]